茶尺蠖水通道蛋白 EoAQP1 的细胞器定位及功能分析

李良德[#], 王定锋[#], 刘丰静, 张 辉, 李慧玲, 吴光远[*]

(福建省农业科学院茶叶研究所, 福建福安 355015)

摘要:【目的】水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种广泛存在于细胞生物膜系统中的跨膜转运蛋白,它在水分渗透压平衡过程中发挥着重要的作用。本研究旨在前期克隆茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout 水通道蛋白 AQP1(EoAQP1)基因全长的基础上,进一步明确该蛋白的细胞器定位,并探析其对细胞形态和增殖的影响。【方法】采用双酶切法构建了绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)载体以及绿色荧光蛋白与 EoAQP1 的真核融合(EoAQP1-GFP)表达载体。通过荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观测了 GFP 与 EoAQP1-GFP 蛋白在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胚胎细胞系(S2)中的表达特征。利用溶酶体和高尔基体红色荧光探针明确了 EoAQP1 蛋白在 S2 细胞内的细胞器定位。通过流式细胞仪和酶标仪检测了 EoAQP1 蛋白对 S2 细胞系细胞的颗粒度、大小和增殖的影响。【结果】成功构建了 GFP 和 EoAQP1-GFP 的真核表达载体,将其分别命名为 pAc5.1-*GFP* 和 pAc5.1-*EoAQP1*-*GFP*。荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观测结果表明,荧光蛋白 GFP 均匀填充于 S2 细胞内稳定表达。融合蛋白 EoAQP1-GFP 存在两种表达形式:一种以类似于溶酶体的球形和橄球形结构,围绕细胞核在细胞质中散点表达;另一种以类似于高尔基体的半球状和弓形结构表达于细胞质中。溶酶体和高尔基体红色荧光探针检测结果表明,EoAQP1 蛋白在溶酶体内没有表达,但与高尔基体完全重叠。流式细胞仪和酶标仪检测结果表明,过表达 EoAQP1 蛋白可使 S2 细胞膨胀增大,细胞颗粒度增强,但对细胞增殖无明显影响。【结论】EoAQP1 定位于高尔基体中行使功能,该蛋白能改变细胞形态,但不能促进细胞的生长。

关键词: 茶尺蠖; 水通道蛋白; 溶酶体; 高尔基体; 细胞形态; 细胞增殖

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)07-0750-10

Localization in organelles and function analysis of aquaporin 1 (AQP1) protein in *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae)

LI Liang-De[#], WANG Ding-Feng[#], LIU Feng-Jing, ZHANG Hui, LI Hui-Ling, WU Guang-Yuan[*] (Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fu′an, Fujian 355015, China)

Abstract: 【Aim】 Aquaporin (AQP) is one of the transmembrane proteins widely existing in cell biological membrane system, and plays an important role in the balance of water osmotic pressure. This study aims to understand the localization of AQP1 in organelles based on the previously cloned full-length cDNA in *Ectropis obliqua* Prout (EoAQP1), and to explore its effects on cell morphology and cell proliferation. 【Methods】 The eukaryotic expression vectors of green fluorescent protein (GFP) and its fusion protein with EoAQP1 (EoAQP1-GFP) were constructed by double enzyme digestion. Cell expression characteristics of GFP and EoAQP1-GFP proteins in *Drosophila melanogaster* embryonic cell

基金项目: 国家茶叶产业技术体系(CARS-23); 福建省现代农业茶叶产业技术体系(2014NK04); 福建省自然科学基金项目(2015J01099); 中国乌龙茶产业协同创新中心专项(闽教科[2015]75 号)

作者简介: 李良德, 男, 1988 年 1 月生, 福建德化人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为昆虫生理学和毒理学, E-mail: liliangde_scau@163.com; 王定锋, 男, 1981 年 4 月生, 福建龙岩人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为害虫生物防治和杀虫微生物分子生物学, E-mail: wangdf2013@yahoo.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: gywupt@163.com

收稿日期 Received: 2017-02-28; 接受日期 Accepted: 2017-05-26

line S2 were observed by fluorescence microscope and confocal scanning laser microscope. The localization of EoAQP1 protein in organelles in S2 cells was detected by Lyso-Tracker Red and Golgi-Tracker Red kit. The effects of EoAQP1 on cell granularity, size and proliferation were detected by flow cytometry and microplate reader. 【Results】The eukaryotic expression vectors of GFP and EoAQP1-GFP were constructed successfully, and named pAc5. 1-*GFP* and pAc5. 1-*EoAQP*1-*GFP*, respectively. Fluorescence microscope and confocal scanning laser microscope observation showed that GFP protein was evenly filled in S2 cells and showed stable expression. The EoAQP1-GFP protein was expressed by two types: one showed scattered expression in the cytoplasm and around the nucleus, in which the EoAQP1-GFP protein was in spherical and spheroidic structure similar to lysosome; the other showed the hemisphere and arched expression in the cytoplasm, in which the EoAQP1-GFP protein was in hemisphere and arch structure similar to the Golgi apparatus. Lyso-Tracker Red and Golgi-Tracker Red kit detection showed that EoAQP1 protein had no expression in lysosome but completely overlapped in the Golgi apparatus. Flow cytometry and microplate reader detection indicated that the overexpression of EoAQP1 protein in S2 cells enhanced cell volume and granularity significantly, but had no significant effect on cell proliferation. 【Conclusion】The EoAQP1 protein is localized and plays functions in the Golgi apparatus. It can change cell morphology, but not promote cell growth.

Key words: *Ectropis obliqua*; aquaporin; lysosome; Golgi apparatus; cell morphology; cell proliferation

水是细胞中的重要成分,它能够沿着渗透压较低的一端自由地通过细胞脂质双分子层,起初人们认为自由扩散是水分子进出细胞的唯一方式。直到 1987 年,有研究小组在人体红细胞中偶然发现了一种 28 kD 左右的特殊蛋白(Agre *et al*., 1987),并且和已报道的牛眼晶状体细胞内嵌蛋白(major intrinsic protein, MIP)(Denker *et al*., 1988)非常相似,因此将该蛋白称之为质膜内在通道类似蛋白(channel-like integral membrane protein, CHIP28)。进一步研究发现,该蛋白在肾小管上皮细胞中大量存在,并且对水具有高渗透性,推测其可能是一种水通道蛋白(aquaporin, AQP)。Preston 等(1992)将该发现的蛋白微注射到非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞中,20 min 后细胞膨胀破裂,而对照组细胞由于没有水分渗透性,则保持细胞结构完整,并通过电生理实验和 Hg^{2+} 敏感性试验发现,水能进入卵母细胞而质子和离子则不能进入(Preston *et al*., 1992),从而证明 CHIP28 是一种专一性的水通道蛋白。

AQP 的发现开辟了水分渗透研究的新领域。在昆虫动物中,目前已在同翅目的大青叶蝉 *Cicadella viri*dis(Beuron *et al*., 1995),同翅目的豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*(Shakesby *et al*., 2009)和长红猎蝽 *Rhodnius prolixus*(Echevarria *et al*., 2001),鳞翅目的斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*(刘海远等, 2013)和茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout(李良德等, 2016),以及双翅目的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(Bradley, 1987)等昆虫中发现了多种 AQP 成员蛋白的存在。前人研究结果表明,AQP 对昆虫体内水分渗透平衡的调节具有重要作用。例如,刺吸式昆虫烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的中肠组织有一个特殊器官——过滤器(filter chambers, FC),通过 AQP 通道能将多余的水分过滤至后肠,以应对消化系统渗透压不平衡的问题(Rosell *et al*., 2003)。又如吸血性昆虫冈比亚按蚊 *A. gambiae* 的马氏管(Malpighian tubules),通过 AQP 通道能在短时间内将多余水分以尿液的形式快速排出体外(Bradley, 1987)。不仅如此,AQP 对抗冻、抗冷和抗干燥也具有重要的作用。例如,二化螟 *Chilo suppressalis* 在极端环境 −25℃ 条件下能正常越冬,利用 $HgCl_2$ 破坏 AQP 蛋白结构后,越冬幼虫在 −20℃ 时将受到损伤而死亡(Izumi *et al*., 2006)。

AQP 作为细胞重要的跨膜蛋白,尽管它在许多昆虫中证实了对水分渗透具有重要的调节作用,但这些研究成果往往只是局限于宏观的组织,如中肠、后肠等,在微观细胞生物膜的定位及功能研究却未见报道。现已明确,细胞膜、核膜以及细胞质中的内质网、高尔基体、线粒体和溶酶体等膜构成了复杂的昆虫细胞生物膜系统,该系统在物质运输、能量交换和信息传递的过程中起着极其重要的作用,而 AQP 调节的水分则是这些生命活动的源泉(Nagae *et al*., 2013)。因而,对 AQP 在昆虫生物膜系统的准确定位有助于进一步了解昆虫细胞渗透机理,同时为害虫的防治提供新的分子靶标。基于此,本研究选取茶园重要害虫茶尺蠖的水通道蛋白 AQP1 为研究对

象,在前期全长基因克隆的基础上(李良德等,2016),进一步构建了该基因的真核表达载体。通过荧光显微镜和激光共聚焦观测了茶尺蠖 AQP1 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胚胎细胞系(S2)中的表达特征。利用溶酶体和高尔基体红色荧光探针明确茶尺蠖 AQP1 在 S2 细胞内的细胞器定位。最后,通过流式细胞仪和酶标仪检测了茶尺蠖 AQP1 对 S2 细胞大小、颗粒度和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 供试细胞、载体和试剂

由于目前尚没有成熟的茶尺蠖细胞系,因此本研究均在黑腹果蝇胚胎细胞系(S2 细胞系)中进行。S2 细胞培养于含有 3 mL 施耐德昆虫培养基(Schneider's insect medium)的 75 cm^2 正方斜口细胞培养瓶中,按细胞培养液与新鲜培养基为 1∶3(v/v)的方式,每 48 h 更换一次新鲜培养基,每周更换一次细胞培养瓶,置于 27℃ 生化培养箱长期传代培养。

真核表达载体 pAc5.1/V5-His 与商业载体 pEGFP-N1 均购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、转染试剂 Lipod 3000 均购自 TaKaRa 公司;施耐德昆虫细胞培养基购自 Fermentas 公司;去内毒素质粒提取试剂盒购自 Sigma 公司;果蝇 S2 细胞系购自上海拜力生物科技有限公司;溶酶体红色荧光探针(Lyso-Tracker Red)、高尔基体红色荧光探针(Golgi-Tracker Red)、细胞增殖检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)、细胞核蓝色荧光染料(Hoechst 33342)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 真核表达载体的构建

根据已知商业载体 pEGFP-N1 的碱基系列,在绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)头尾端设计含有 *Bst*B Ⅰ 和 *Pme* Ⅰ 的双酶切位点引物,以 pEGFP-N1 载体为模板,PCR 克隆获得含有双酶切位点的 GFP 基因全长。PCR 反应程序:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。再将该基因与真核表达载体 pAc5.1/V5-His 同时进行 *Bst*B Ⅰ/*Pme* Ⅰ 双酶切,通过 T4 连接酶重新构建了 GFP 真核表达载体 pAc5.1-GFP。类似地,根据前期已获得的茶尺蠖水通道蛋白基因 *EoAQP*1(GenBank 登录号: KT819587)的全长,在 ORF 头尾编码区设计含有 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 的双酶切位点引物,按照: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存的反应程序,克隆获得了含有双酶切位点的 *EoAQP*1 ORF 序列全长。再将该序列与上述真核表达载体 pAc5.1-*GFP* 进行 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切,连接后重新构建了含有 *GFP* 和 *EoAQP*1 ORF 的真核表达载体 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP*。*GFP* 与 *EoAQP*1 ORF 的克隆引物序列参照李良德等(2016)。

1.3 EoAQP1-GFP 蛋白细胞表达特征观测

pAc5.1-*GFP* 和 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 两重组质粒构建成功后,通过质粒提取试剂盒对其进行提取并测定浓度,然后进行转染实验。转染前一夜将细胞传至 6 孔细胞培养板中,每孔细胞覆盖率达 50% ~ 70% 为宜,每孔加入细胞培养液 150 mL,隔夜至细胞状态稳定后,参照 LipoD 3000 转染试剂操作说明,将 pAc5.1-*GFP* 和 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 两重组质粒分别转入 S2 细胞系中,置于 27℃ 条件下培养。

转染 36 h 后,利用荧光显微镜观察 GFP 蛋白和 EoAQP1-GFP 融合蛋白的表达情况,确定两蛋白稳定表达后,利用激光共聚焦显微镜根据细胞核和细胞膜的位置初步明确 EoAQP1 蛋白的表达位置,再根据各细胞器的形态特征结合 EoAQP1 蛋白的表达特性,进一步判断 EoAQP1 蛋白的细胞器定位。

1.4 茶尺蠖 EoAQP1 溶酶体定位

参照溶酶体色荧光探针试剂盒说明书,先将保存于 4℃ 的红色荧光探针 Lyso-Tracker Red 于 25℃ 条件下恒温水浴片刻至其融解,并使用细胞培养液将探针稀释至终浓度为 75 nmol/L 后,于 37℃ 条件下恒温水育备用。取出表达有 GFP 蛋白和 EoAQP1-GFP 融合蛋白的细胞培养板,去除细胞培养液后,加入 37℃ 预温育的 Lyso-Tracker Red 染色工作液,与细胞共孵育 30 min 后,去除 Lyso-Tracker Red 染色工作液,加入新鲜细胞培养基。此时,溶酶体呈明亮的红色荧光,而细胞内其他膜系统则不染色。最后,通过激光共聚焦显微镜观测染成红色的溶酶体位置及表达绿光的 EoAQP1-GFP 融合蛋白位置,通过两种颜色的位置是否重叠判定 EoAQP1 蛋白是否定位于溶酶体。

1.5 茶尺蠖 EoAQP1 高尔基体定位

参照高尔基体色荧光探针试剂盒说明书,先将红色荧光探针 Golgi-Tracker Red 与稀释液按照 1∶100的比例(v/v)进行稀释,混合均匀后于 4℃ 条

件下保存备用。取出表达有 GFP 蛋白和 EoAQP1-GFP 融合蛋白的细胞培养板，去除细胞培养液后，加入事先配置好的 Golgi-Tracker Red 染色工作液，于 4℃条件下进行孵育。孵育 30 min 后，去除 Golgi-Tracker Red 染色工作液，加入新鲜细胞培养基，于 37℃条件下继续孵育 30 min。此时，高尔基体呈明亮的红色荧光，而细胞内其他膜系统则不染色。最后，通过激光共聚焦显微镜观测染成红色的高尔基体位置及表达绿光的 EoAQP1-GFP 融合蛋白位置，通过两种颜色的位置是否重叠判定 EoAQP1 蛋白是否定位于高尔基体。

1.6　茶尺蠖 EoAQP1 对细胞形态的影响

为排除 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 载体中 GFP 绿光对流式细胞仪检测造成的影响，将已获得的真核表达载体 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 通过限制性内切酶 *Bst*B Ⅰ 和 *Pme* Ⅰ 进行双酶切，并用 T4 连接酶重新构建去除 *GFP* 但含有 *EoAQP*1 序列的真核表达载体，将其命名为 pAc5.1-*EoAQP*1。最后，以 pAc5.1/V5-His（简称 pAc5.1）载体为参照，将 pAc5.1-*EoAQP*1 与 pAc5.1 转入置 S2 细胞系中，48 h 后洗涤并收集细胞，用磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS）重悬后，用于流式细胞仪（BD ACCURI C6 PLUS）检测该蛋白对细胞形态的影响。

1.7　茶尺蠖 EoAQP1 对细胞增殖的影响

实验前，先将 S2 细胞接种置 96 孔板中，每孔细胞加入 100 μL 细胞培养液，于培养箱 27℃条件下过夜培养。待细胞稳定后，将真核载体 pAc5.1-EoAQP1 与 pAc5.1 分别转入 S2 细胞系中，于 27℃条件下继续培养。待每孔细胞生长至一定密度后（每孔约 2 000 个细胞），更换新鲜细胞培养基。参照 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒说明书，按照 CCK-8 处理液与细胞培养液为 1∶10 的比例（v/v）对细胞进行刺激处理。再将处理的细胞于细胞培养箱内继续孵育 1 h 后，使用酶标仪于 450 nm 条件下进行吸光度测定。最后，根据吸光度值计算相应细胞增值率。

1.8　数据统计与分析

EoAQP1 蛋白在 S2 细胞中的表达特征及该蛋白的细胞器的定位图由 Adobe Illustrator CS4 软件进行编辑，采用 Photoshop CS4 软件进行剪切压缩得到。采用 SPSS 13.0 邓肯氏新复极差法（Duncan's multiple range test）单因素方差分析（one-way ANOVA）对细胞形态及增值率数据进行差异性显著分析（$P < 0.05$），每组试验重复 3 次，数据以平均值 ± 标准误（*SE*）表示。

2　结果

2.1　茶尺蠖 EoAQP1 的细胞表达特征

2.1.1　EoAQP1 在黑腹果蝇 S2 细胞内的散点表达：分别将 pAc5.1-*GFP* 与 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 2 种质粒转至 S2 细胞中，转染 24 h 后，利用荧光显微镜观察 GFP 和融合蛋白 EoAQP1-GFP 的表达情况。结果表明，荧光蛋白 GFP 和融合蛋白 EoAQP1-GFP 均能在 S2 细胞内表达（图 1：A ~ C）。其中，转入 pAc5.1-GFP 的细胞绿光分布均匀（图 1：C），表明 GFP 标签可用于融合蛋白的定位观察，而融合蛋白 EoAQP1-GFP 则以颗粒状形式随机表达于 S2 细胞内（图 1：A ~ B）；进一步通过激光共聚焦显微镜观测了荧光蛋白 GFP 和融合蛋白 EoAQP1-GFP 在细胞内的表达特征，清晰可见 GFP 均匀填充于整个细胞内（图 1：F），而 EoAQP1-GFP 则以球形和橄球形结构围绕细胞核在细胞质中大量散点表达（图 1：D ~ E）。

2.1.2　EoAQP1 在黑腹果蝇 S2 细胞内的半球和弓形表达：利用荧光显微镜观测了 GFP 和融合蛋白 EoAQP1-GFP 的表达情况。结果表明，EoAQP1-GFP 蛋白除了以颗粒状、散点表达外，还以半球状形式表达于细胞膜周边（图 2：A ~ B）；进一步通过激光共聚焦显微镜观测了该蛋白在 S2 细胞内的表达形态，清晰可见 EoAQP1-GFP 除以半球状形式表达于细胞质中（图 2：D），还出现了特殊的弓形状表达（图 2：E），且其在细胞质中占了很大位置，GFP 蛋白绿光分布均匀（图 2：C，F）。

2.2　茶尺蠖 AQP1 的细胞器定位

2.2.1　EoAQP1 溶酶体定位检测：EoAQP1 具有经典的跨膜结构，因而该蛋白有可能在任何细胞生物膜系统中行使转运水分的功能。根据 2.1.1 节结果可知，该蛋白大量存在于细胞质中，在细胞膜和核膜处均不表达，且具有球形和橄球形结构（图 1），该现象与细胞内溶酶体的特征较为相近，初步判断 EoAQP1 蛋白定位于溶酶体中行使功能。

为明确该推断是否正确，采用溶酶体红色荧光探针将表达 EoAQP1-GFP 蛋白的 S2 细胞内的溶酶体进行染色，将该细胞命名为 S2-EoAQP1-GFP-Lys，在激光共聚焦显微镜下观测 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞内的 EoAQP1-GFP 绿色蛋白及红色溶酶体是否重叠。结果表明，融合蛋白 EoAQP1-GFP 表达的绿光清晰可见（图3：D ~ F），颗粒状溶酶体红光染色明

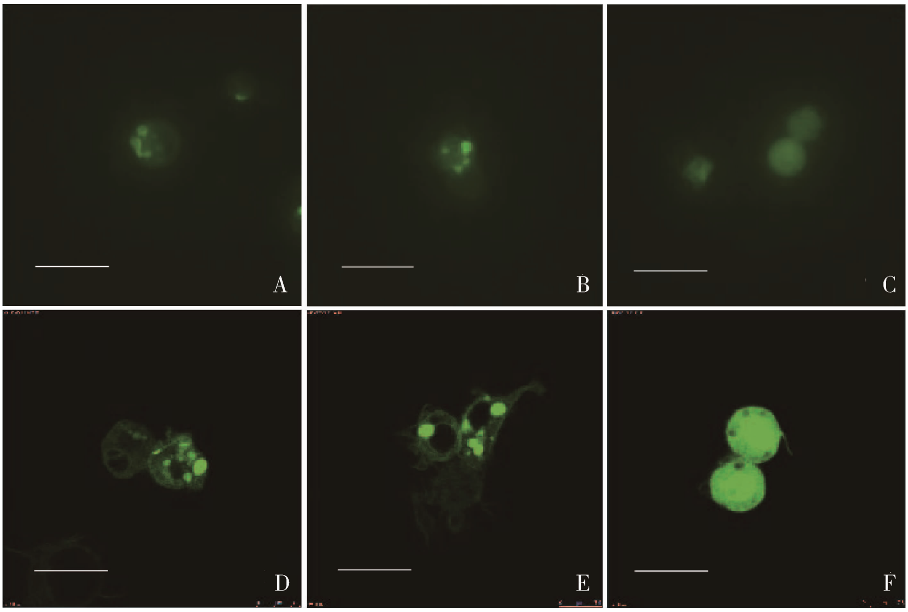

图 1　EoAQP1 在黑腹果蝇 S2 细胞内的散点表达

Fig. 1　Scattered expression of EoAQP1 in *Drosophila melanogaster* S2 cells

A – C：荧光显微镜观察 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 表达的 EoAQP1-GFP 蛋白（A，B）和 pAc5.1-*GFP* 表达的 GFP 蛋白（C）Observations of EoAQP1-GFP protein from pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP*（A，B）and GFP protein from pAc5.1-*GFP*（C）under the fluorescence microscope；D – F：激光共聚焦显微镜观察 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 表达的 EoAQP1-GFP 蛋白（D，E）和 pAc5.1-*GFP* 表达的 GFP 蛋白（F）Observations of EoAQP1-GFP protein from pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP*（D，E）and GFP protein from pAc5.1-*GFP*（F）under the confocal scanning laser microscope. 标尺 Scale bar = 20 μm.

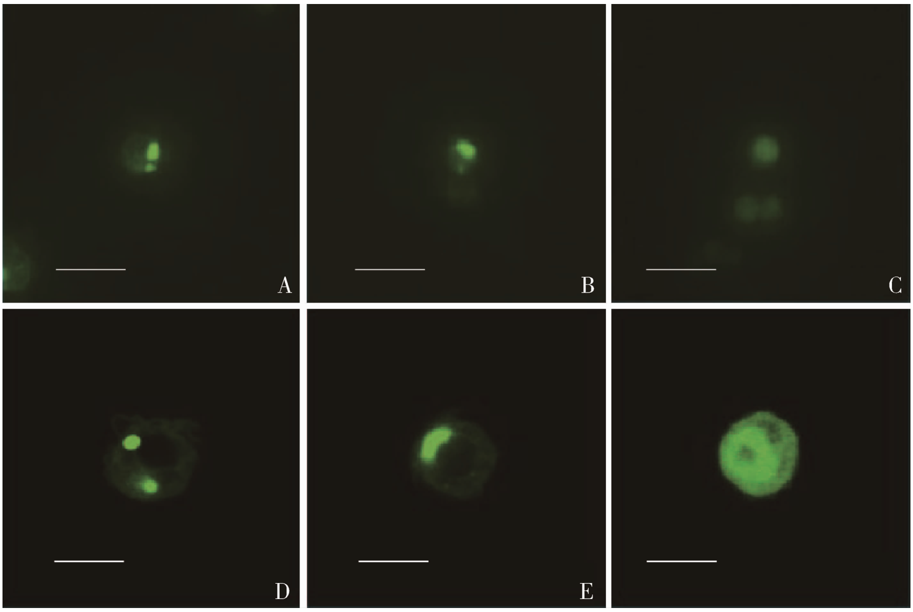

图 2　EoAQP1 在黑腹果蝇 S2 细胞内的半球和弓形表达

Fig. 2　Hemisphere and arched expression of EoAQP1 in *Drosophila melanogaster* S2 cells

A – C：荧光显微镜观察 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 表达的 EoAQP1-GFP 蛋白（A，B）和 pAc5.1-*GFP* 表达的 GFP 蛋白（C）Observations of EoAQP1-GFP protein from pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP*（A，B）and GFP protein from pAc5.1-*GFP*（C）under the fluorescence microscope；D – F：荧光显微镜观察 pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP* 表达的 EoAQP1-GFP 蛋白（D，E）和 pAc5.1-*GFP* 表达的 GFP 蛋白（F）Observations of EoAQP1-GFP protein from pAc5.1-*EoAQP*1-*GFP*（D，E）and GFP protein from pAc5.1-*GFP*（F）under the confocal scanning laser microscope. 标尺 Scale bar = 20 μm.

显（图 3：G ~ I），以及用于观测的 S2-EoAQP1-GFP-Lys 蓝光细胞生长良好（图 3：A ~ C）。最后将图合并，发现 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞内的 EoAQP1-GFP 蛋白所表达位置与溶酶体所处位点不相重叠（图 3：J ~ L），因而否定了 EoAQP1 定位于溶酶体中行使功能的推断。

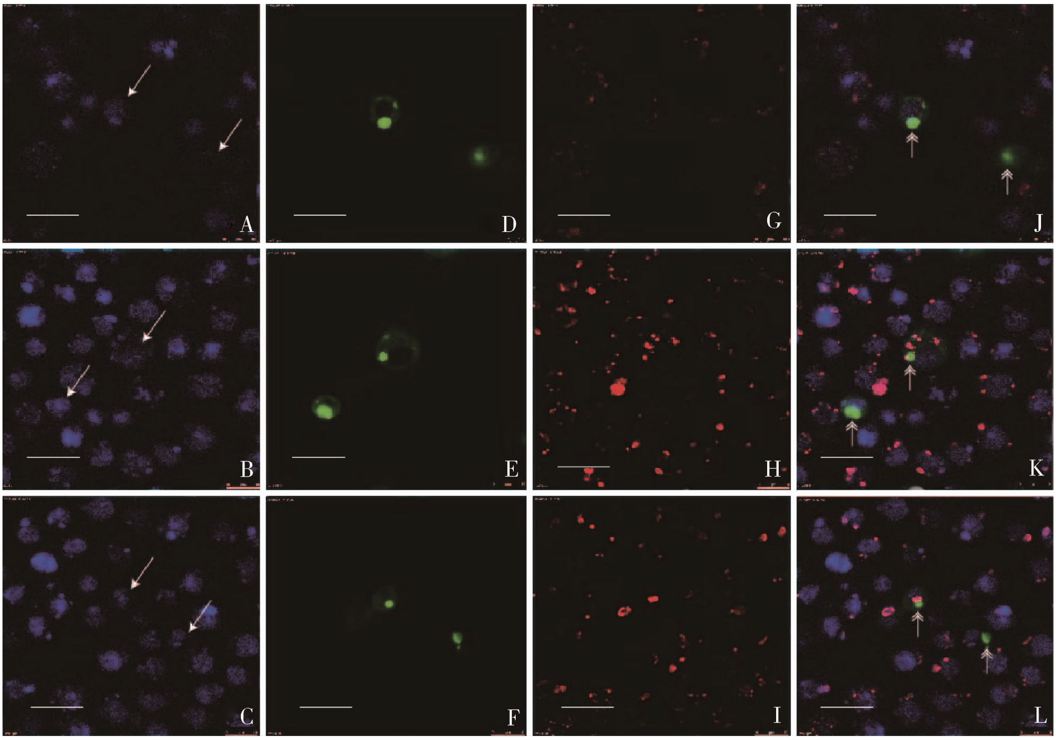

图 3　EoAQP1 在黑腹果蝇 S2 细胞溶酶体内的定位

Fig. 3　Localization of EoAQP1 in lysosome of *Drosophila melanogaster* S2 cells

S2-EoAQP1-GFP-Lys：溶酶体已被染色且表达有 EoAQP1-GFP 蛋白的 S2 细胞 S2 cells with dyed lysosome，expressing EoAQP1-GFP protein. A－C：激光共聚焦显微镜蓝光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Lys cells by the confocal scanning laser microscope under the blue ray condition；D－F：激光共聚焦显微镜绿光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Lys cells by the confocal scanning laser microscope under the green ray condition；G－I：激光共聚焦显微镜红光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Lys cells by the confocal scanning laser microscope under the red ray condition；J－L：分别为前 3 图的合并图 Merged pictures of the former three，respectively；单向箭头为表达 EoAQP1-GFP 蛋白的细胞位置，双向箭头的 S2-EoAQP1-GFP-Lys 细胞胞内 EoAQP1 蛋白与溶酶体不相重叠。The one-way arrows point the cells expressing EoAQP1-GFP protein，and the double sided arrows point the intracellular EoAQP1 protein non-overlapping with lysosomes in S2-EoAQP1-GFP- Lys cells. 标尺 Scale bar＝20 μm.

2.2.2　EoAQP1 高尔基体定位检测：同样地，根据 2.1.2 节观察结果可知，EoAQP1-GFP 除以颗粒状、散点表达外，还有以半球状和弓形状形式表达于细胞膜周边，该现象与细胞内高尔基体的特征较为相近，初步判断 EoAQP1 定位于高尔基体中行使功能。

为明确该推断是否正确，采用高尔基体红色荧光探针将表达 EoAQP1-GFP 蛋白的 S2 细胞内的高尔基体进行染色，将该细胞命名为 S2-EoAQP1-GFP-Gol，在激光共聚焦显微镜下观测 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞内的 EoAQP1-GFP 绿色蛋白及红色高尔基体是否重叠。结果表明，半球状、弓形状的融合蛋白 EoAQP1-GFP 表达的绿光清晰（图 4：D～F），高尔基体红光染色明显（图 4：G～I），以及用于观测的 S2-EoAQP1-GFP-Gol 蓝光细胞生长良好（图 4：A～C）。最后将图合并，发现 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞内的 EoAQP1-GFP 蛋白所表达位置与高尔基体所处位点完全重叠（图 4：J～L），验证了 EoAQP1 定位于高尔基体中行使功能的推断。

2.3　茶尺蠖 AQP1 对细胞形态及增殖的影响

2.3.1　EoAQP1 对细胞形态的影响：将重组质粒 pAc5.1-*EoAQP*1 转入 S2 细胞系中（图 5：A），以空质粒 pAc5.1 为对照（图 5：B），转染 48 h 后通过流式细胞仪检测该蛋白对 S2 细胞形态的影响（图 5）。

结果表明，转入 pAc5.1-*EoAQP*1 质粒的细胞颗粒度明显增多，比转染空质粒 pAc5.1 的细胞增加了 31.91％。同时，该蛋白能使 S2 细胞大量渗透吸水，使 S2 细胞膨胀 89.19％。最后，将细胞颗粒度与细胞大小进行综合分析，S2 细胞复杂度增加了 83.05％。综上所述，转录 EoAQP1 蛋白可使细胞颗粒度增强、体积变大，差异极显著（图 6）。

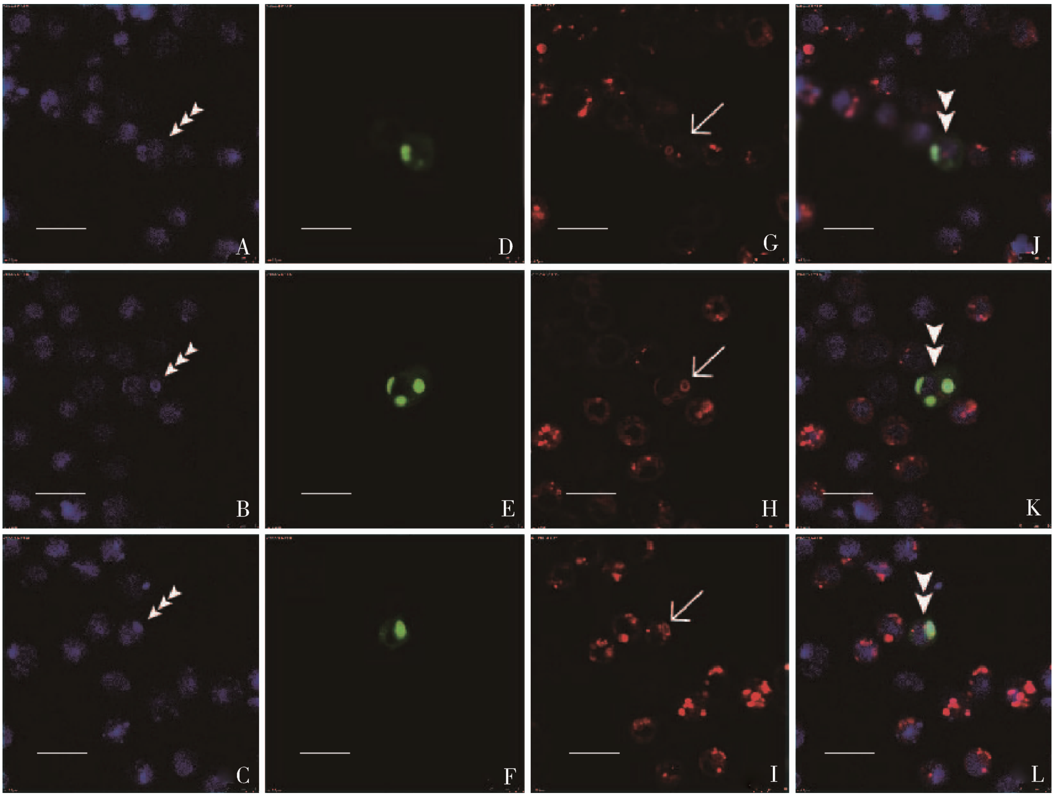

图 4 EoAQP1 在黑腹果蝇胚胎细胞系 S2 细胞高尔基体内的定位

Fig. 4 Localization of EoAQP1 in Golgi apparatus of *Drosophila melanogaster* S2 cells

S2-EoAQP1-GFP-Gol：高尔基体已被染色且表达有 EoAQP1-GFP 蛋白的 S2 细胞 S2 cells with dyed Golgi apparatus, expressing EoAQP1-GFP protein. A－C：激光共聚焦显微镜蓝光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Gol cells by the confocal scanning laser microscope under the blue ray condition；D－F：激光共聚焦显微镜绿光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Gol cells by the confocal scanning laser microscope under the green ray condition；G－I：激光共聚焦显微镜红光条件下观察 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞 Observations of S2-EoAQP1-GFP-Gol cells by the confocal scanning laser microscope under the red ray condition；J－L：分别为前 3 组图的合并图 Merged picture of the former three, respectively. 单向箭头为高尔基体染体，三向箭头为表达 EoAQP1-GFP 蛋白的细胞位置，双向箭头指示 S2-EoAQP1-GFP-Gol 细胞胞内 EoAQP1 蛋白与溶酶体完全重叠。The one-way arrows point the Golgi apparatus dyed by red fluorescent probe, the three-way arrows point the cells expressing EoAQP1-GFP protein, and the double sided arrows point the intracellular EoAQP1 protein completely overlapping with Golgi apparatus in S2-EoAQP1-GFP-Gol cells. 标尺 Scale bar＝20 μm.

2.3.2 EoAQP1 对细胞增殖的影响：将重组质粒 pAc5.1-*EoAQP*1 转入 S2 细胞系中，以空质粒 pAc5.1 为对照，转染 48 h 后通过酶标仪检测该蛋白对 S2 细胞增殖的影响。结果表明，该蛋白能使 S2 细胞生长速度提高 2.74%，但差异不显著（图 7），表明过表达 EoAQP1 蛋白不能促进细胞的生长。

3 结论与讨论

目前，主要在植物中有关水通道蛋白的细胞器定位研究比较成熟。根据水通道蛋白的序列特征，可将植物 AQP 分为 4 类，即液泡膜膜内蛋白（tonoplast intrinsic proteins, TIPs）、质膜膜内蛋白（plasma intrinsic proteins, PIPs）、小碱性膜内蛋白（small and basic intrinsic protein, SIPs）及根瘤共生膜内蛋白（NOD26-like intrinsic proteins, NIPs）（Johanson *et al*., 2001）。其中，TIPs 主要定位于液泡膜上（Maurel, 1997），PIPs 定位于细胞膜上（Schaffner, 1998），SIPs 定位于内质网膜上（Ishikawa *et al*., 2005），NIPs 定位于细菌和植物的共生体膜上（Fortin *et al*., 1987）。另外，有研究报道，PIPs 也存在于高尔基体的小囊泡中，这可能是由于蛋白在分泌途径中，通过小的囊泡搬运至高尔基体进行包装随后转运至细胞膜的结果（Kim and Grierson, 2005）。在高等动物中，有研究发现，人体 AQP2 主要分布于高尔基体分泌的小泡中，当血管加压后，AQP2 能够转移至细胞质膜中，增加细胞的水通透性（Ward *et al*., 1999）。在昆虫界中，有报道

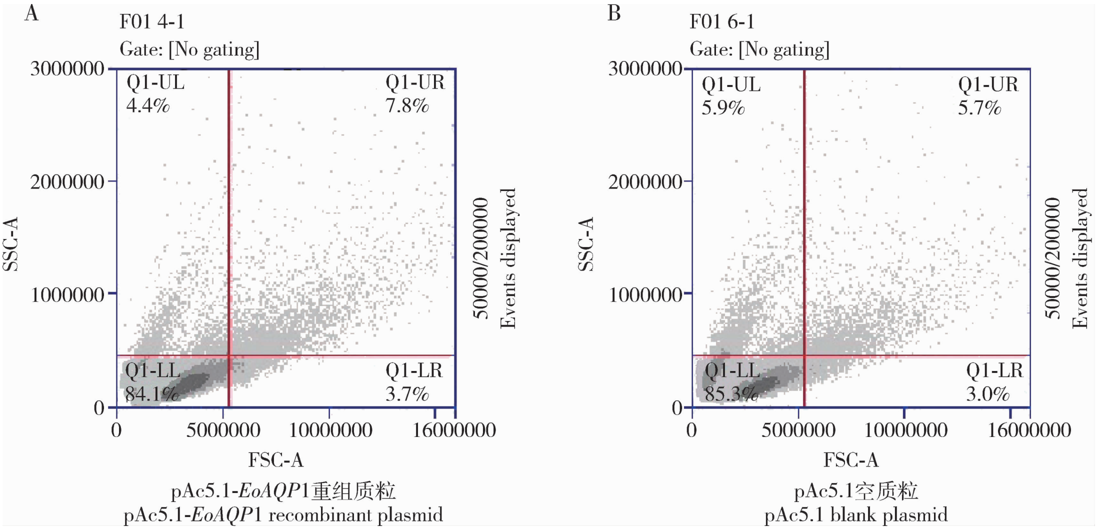

图 5　转入 pAc5.1-*EoAQP*1（A）和 pAc5.1（B）质粒的流式细胞图

Fig. 5　Flow cytometry photos after transfection of pAc5.1-*EoAQP*1 (A) and pAc5.1 (B) plasmid

Q1-LL：正常细胞 Normal cell；Q1-LR，Q1-UL，Q1-UR：分别代表细胞颗粒度、细胞大小以及该两项指标都发生变化的细胞 Cells with their granularity, size and both changed, respectively.

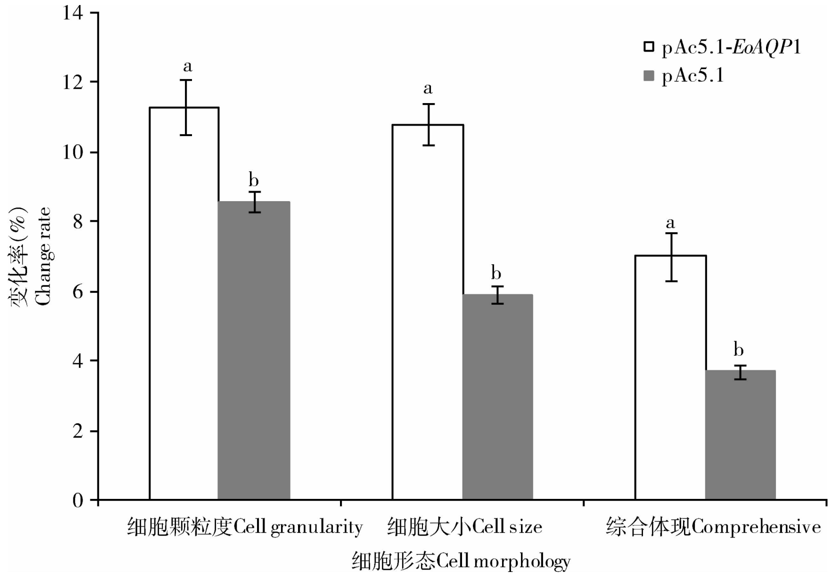

图 6　EoAQP1 对黑腹果蝇 S2 细胞形态的影响

Fig. 6　Effects of EoAQP1 on cell morphology of *Drosophila melanogaster* S2 cells

转染 pAc5.1-*EoAQP*1 质粒和 pAc5.1 空质粒对黑腹果蝇 S2 细胞形态的影响 Effects of transfection of pAc5.1-*EoAQP*1 and pAc5.1 plasmid on cell morphology, respectively. 数据采用平均值 ± 标准误,每组试验重复 3 次,柱上不同字母代表不同处理的显著性差异($P<0.05$)(邓肯氏新复极差法)。Data are presented as means ± *SE* in triplicate, and different letters above bars indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test).

发现烟粉虱 *Bemisia tabaci* AQP1(BtAQP1)存在 2 种转录异构体,其中一种转录异构体主要定位于细胞膜中,而另一种为在 C 端缺少 16 个氨基酸的异构体,通过高尔基体囊泡分泌到细胞质参与水分渗透(Mathew *et al*., 2011)。本研究通过红色荧光探针对茶尺蠖 EoAQP1 进行细胞器定位,结果表明,该蛋白不存在于溶酶体,而是在高尔基体中行使水分的渗透功能。该研究结果与上述报道的植物 PIPs 蛋白、人体 AQP2 蛋白和烟粉虱 BtAQP1 蛋白定位及功能一致,很好地解释了为什么茶尺蠖 EoAQP1 在细胞内有类似于溶酶体的球形和橄球形结构在细胞质中大量散点表达,推测是该蛋白由高尔基体的囊泡分泌到细胞质导致的结果。

现已明确,昆虫 AQP1 在细胞水分运输、离子选

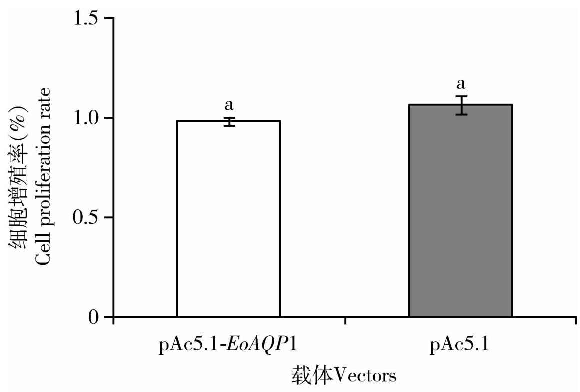

图 7 EoAQP1 蛋白对黑腹果蝇 S2 细胞增殖率的影响
Fig. 7 Effects of EoAQP1 protein on cell proliferation rate of *Drosophila melanogaster* S2 cells

数据采用平均值 ± 标准误,每组试验重复 3 次,柱上相同字母代表不同处理差异不显著($P > 0.05$)(邓肯氏新复极差法)。Data are presented as means ± *SE* in triplicate, and the same letters above bars indicate insignificant differences among different treatments ($P > 0.05$) (Duncan's multiple range test).

择透过性和渗透压平衡等过程中发挥着重要的作用。在非洲爪蟾卵母细胞实验中,将体外转录合成的 CHIP28 cRNA 注入非洲爪蟾的卵母细胞中,发现在低渗溶液中,卵母细胞膨胀迅速,细胞体积增加 30% ~ 50%,并于 5 min 内破裂(Preston *et al*., 1992)。本研究在果蝇胚胎 S2 细胞中过表达茶尺蠖 EoAQP1 蛋白,低渗 S2 细胞膨胀显著,研究结果与非洲爪蟾卵母细胞实验相符。另外,在细胞学实验中有研究发现,AQP 还参与一些列特殊的生理功能,包括细胞迁移(cell migration)(Bulow *et al*., 2012)和粘附作用(Tatsumi *et al*., 2009)以及神经信号转导和细胞凋亡(Lee and Thevenod, 2006; Campbell *et al*., 2008)。在黑腹果蝇中肠组织中,AQP1 还受蜕皮激素信号(ecdysone signaling)的调控(Gautam and Tapadia, 2010)。本研究通过过表达茶尺蠖 EoAQP1,发现该蛋白对 S2 细胞增殖无明显影响,但使细胞颗粒度显著增加,推测该蛋白在细胞内参与了一些特殊的生理功能,如细胞凋亡(细胞分解成凋亡小体,颗度增加)等,但具体生理作用仍需我们后续作更进一步验证。

综上所述,本研究在前期克隆获得茶尺蠖水通道蛋白 EoAQP1 基因 cDNA 全长的基础上(李良德等, 2016),选择具有多个酶切位点的真核表达载体 pAc5.1/V5-His 体外过表达 EoAQP1,并通过绿色荧光标记基因 *GFP* 检测该重组质粒在 S2 细胞中是否发生稳定表达。为明确该蛋白在 S2 细胞的表达特征,本文通过荧光显微镜和激光共聚焦显微镜对表达的蛋白做了初步分析,结果表明该蛋白有类似于溶酶体的球形和橄球形结构,围绕细胞核在细胞质中大量散点表达,也有类似于高尔基体的半球状和弓形态结构表达于细胞质中。进一步通过红色荧光探针研究发现,该蛋白不存在于溶酶体,而是在高尔基体中行使水分的渗透功能。最后,通过流式细胞仪和酶标仪检测了该蛋白对 S2 细胞形态和增殖的影响。结果表明,转录 EoAQP1 蛋白可使细胞体积变大,颗粒度增强,但对细胞增殖无明显影响。

参考文献(References)

Agre P, Saboori AM, Asimos A, Smith BL, 1987. Purification and partial characterization of the M_r 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J. Biol. Chem*., 262(36): 17497 - 17503.

Beuron F, Le Caherec F, Guillam MT, Cavalier A, Garret A, Tassan JP, Pelamarche C, Schultz P, Mallouh V, Hubert JF, Gouranton J, Thomas D, 1995. Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *J. Biol. Chem*., 270(29): 17414 - 17422.

Bradley TJ, 1987. Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol*., 32(1): 439 - 462.

Bulow JV, Muler-Lucks A, Kai L, Bernhard F, Beitz E, 2012. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *J. Biol. Chem*., 287: 7487 - 7494.

Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS, 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 178(8): 935 - 955.

Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P, 1988. Identification, purification, and partial characterization of a novel M_r 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem*., 263(30): 15634 - 15642.

Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez-Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA, Whittembury G, 2001. Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflugers Arch*., 442(1): 27 - 34.

Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS, 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res*., 15(2): 813 - 824.

Gautam NK, Tapadia MG, 2010. Ecdysone signaling is required for proper organization and fluid secretion of stellate cells in the Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol*., 54(4): 635 - 642.

Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M, 2005. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*., 579(25): 5814 - 5820.

Izumi Y, Sonoda S, Yoshida H, Danks HV, Tsumuki H, 2006. Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect Physiol.*, 52(2): 215-220.

Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovall S, Fraysse LR, Weig A, Kjellbom P, 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.*, 126(4): 1358-1369.

Kim SH, Grierson D, 2005. Subcellular localisation and silencing of ripening-associated membrane protein (TRAMP) in tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Sci.*, 169(6): 1022-1029.

Lee WK, Thevenod F, 2006. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291(2): 195-202.

Li LD, Wang DF, Liu FJ, Li HL, Zhang H, Wu GY, 2016. cDNA cloning, preparation of polyclonal antibody and subcellular localization of aquaporin 1 (AQP1) in *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geoqmetridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 382-391. [李良德, 王定锋, 刘丰静, 李慧玲, 张辉, 吴光远, 2016. 茶尺蠖水通道蛋白 EoAQP1 的 cDNA 克隆、多克隆抗体制备及亚细胞定位. 昆虫学报, 59(4): 382-391]

Liu HY, Shu BS, Jiang CL, Li LD, Zhong GH, 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of aquaporin1 (AQP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(4): 339-349. [刘海远, 舒本水, 姜春来, 李良德, 钟国华, 2013. 斜纹夜蛾水通道蛋白 1(AQP1)基因的克隆分子特性和表达分析. 昆虫学报, 56(4): 339-349]

Mathew LG, Campbell EM, Yool AJ, Fabrick JA, 2011. Identification and characterization of functional aquaporin water channel protein from alimentary tract of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(3): 178-190.

Maurel C, 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Biol.*, 48(1): 399-429.

Nagae T, Miyake S, Kosaki S, Azuma M, 2013. Identification and characterisation of a functional aquaporin water channel (*Anomala cuprea* DRIP) in a coleopteran insect. *J. Exp. Biol.*, 216(14): 2564-2572.

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P, 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256(5055): 385-387.

Rosell RC, Davidson EW, Jancovich JK, Hendrix DL, Brown JK, 2003. Size limitations in the filter chamber and digestive tract of nymphal and adult *Bemisia tabaci* whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96(4): 544-552.

Schäffner AR, 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta*, 204(2): 131-139.

Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J, Roberts DM, Douglas AE, 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1): 1-10.

Tatsumi K, Tsuji S, Miwa H, Morisaku T, Nuriya M, Orihara M, Kaneko K, Okano H, Yasui M, 2009. *Drosophila* big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. *FEBS Lett.*, 583(12): 2077-2082.

Ward DT, Hammond TG, Harris HW, 1999. Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 683-697.

（责任编辑：马丽萍）